

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP98/6546
06. Nov. 1998

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	04 DEC 1998
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH in Ingelheim/
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Tumorvakzine"

am 18. Oktober 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das Symbol
A 61 K 39/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 22. Oktober 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts
im Auftrag

Aktenzeichen: 197 46 173.5

Agrurks

M 06 · 10 · 98

Case 12/193

DI Fa/dc

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
D-55216 Ingelheim am Rhein

Titel: Tumorvakzine

••• 06.11.96

Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Immuntherapie von Tumorerkrankungen.

Die meisten malignen Tumore entgehen erfolgreich einer Kontrolle durch das Immunsystem, obwohl eine Vielzahl von ihnen tumorassoziierte Antigene exprimiert (van der Bruggen, 1991; Brichard, 1993; Gaughler, 1994; Coulie, 1994). Es hat sich gezeigt, daß neben der Präsentation der geeigneten Antigene zusätzlich bestimmte Adjuvantien notwendig sind, um eine effektive Stimulierung des Immunsystems zu erzielen (Zier, 1995).

Anfängliche Studien zielten ab auf eine Stimulierung des Immunsystems durch Vakzinierung mit inaktivierten Tumorzellen in Kombination mit unspezifischen Immunstimulatoren, wie BCG oder anderen bakteriellen Adjuvantien und führten in einigen Fällen zu einer Verbesserung der Überlebensrate von Patienten mit malignen Tumoren (Berd, 1990; Barth, 1994; Morton, 1992). Die Wirkung dieser Adjuvantien ist allerdings nicht direkt, sondern verläuft über die Ausschüttung einer Kaskade von endogenen Zytokinen und Mediatoren und ist daher einerseits nicht spezifisch, andererseits kaum reproduzierbar. Dies erschwert eine Anwendung dieser unspezifischen Adjuvantien in einer pharmazeutischen Zusammensetzung.

In moderneren Ansätzen werden direkt die immunstimulierenden Zytokine als Adjuvantien eingesetzt (Rosenberg, 1988, Rosenberg, 1989). Unter den immunstimulierenden Zytokinen haben sich vor allem Interleukin-2 (IL-2), Interferon- α (IFN-) α , Interferon- γ , (IFN- γ) IL-12, und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor) als erfolgversprechend gezeigt (Rosenberg, 1991; Dranoff,

1993; Zatloukal, 1993; Ferrantini, 1994; Lamont, 1996; Clary, 1996).

Bei der Erprobung verschiedener Zytokine hat sich gezeigt, daß ihre Wirkung stark von Parametern wie 1) Ort und Art der Applikation; 2) Dosis und 3) Wirkdauer abhängig ist. So hatte z.B. eine systemische Applikation von rekombinantem IL-2 weniger die erwünschte Induktion einer antitumoralen Immunantwort als vielmehr schwere toxische Nebenwirkungen, sogar therapiebedingte Todesfälle, zur Folge (Rosenstein et al., 1986; Rosenberg et al., 1989; Perez et al., 1991). Die schweren Nebenwirkungen resultieren aus einer Verwendung der Zytokine unter Nichtbeachtung ihrer physiologischen Wirkungsmechanismen. Zytokine sind pleiotrope Mediatoren, die natürlicherweise zur Kommunikation zwischen nahe beieinander gelegenen Zellen dienen, sie wirken über geringe Entfernung. Freisetzung und Wirkort der Zytokine liegen also unter physiologischen Bedingungen lokal eng beieinander (Pardoll, 1995). Um bei einer systemischen Applikation genügend hohe Konzentrationen des Zytokins am angestrebten Zielort zu erreichen, müssen hohe Dosen appliziert werden (Rosenberg et al., 1989), die zu ausgeprägten Wirkungen auch an unerwünschten Zielorten führen.

Die moderne Idee und das angestrebte Prinzip einer Tumorvakzine ist die Induktion einer systemischen, gegen den Tumor gerichteten Immunreaktion mit Hilfe eines gleichzeitigen, gezielten Angebotes von relevanten Tumorantigenen und immunstimulatorischen Zytokinen, jedoch nicht über die hochdosierte systemische Gabe von Zytokinen, sondern vielmehr über längere Zeiträume wirkende, lokal hohe Zytokindosen am Vakzinierungsort

• 106-11 90

(parakrines Konzept) (Pardoll, 1995; Jaffe et al., 1996).

Eine lokale Anwendung der Zytokine ist jedoch technisch problematisch, vor allem wegen des schnellen Wegdiffundierens der Zytokine (innerhalb von Minuten) in die umgebenden Gewebe bzw. in den Blutkreislauf, gepaart mit einer oft extrem geringen Halbwertszeit (Inaktivierung) in biologischen Flüssigkeiten (Eppstein, 1982; Kedar et al., 1994; Koppenhagen, 1997).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß eine lokale, auf den Vakzinierungsort begrenzte, und über einen längeren Zeitraum wirkende Zytokinfreisetzung durch eine Injektion von Tumorzellen, die mit dem das Zytokin kodierenden Gen transfiziert und so zu Zytokin-Produzenten gemacht worden sind, erreicht werden kann (Fearon et al., 1990; Gansbacher et al., 1990; Rosenberg et al., 1992; Dranoff et al., 1993). In Tiermodellen wurde gezeigt, daß Vakzine auf der Basis von Zytokin-genmodifizierten Tumorzellen eine systemische, spezifisch gegen den Tumor gerichtete Immunantwort induzieren können, die die Tiere vor einem hochtumorigenen Tumorchallenge schützt (Zatloukal et al., 1993; Zatloukal et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Schweighoffer et al., 1996). In einigen Fällen konnten sogar kleine, bereits vor der Vakzinierung etablierte Tumore beseitigt werden (Clary et al., 1996; Clary et al., 1997). Obwohl mit dem Ansatz unter Verwendung von genmodifizierten Tumorzellen der physiologischen parakrinen Wirkungsweise der Zytokine Rechnung getragen wird, hat sich die Zytokindosis als ein weiterer entscheidender Parameter herausgestellt. So wurde gezeigt, daß für die Stimulierung einer Immunantwort die Zytokine innerhalb eines therapeutisch wirksamen Dosisfensters appliziert werden müssen, zu niedrige,

aber auch zu hohe Zytokindosen waren nicht effektiv (Zatloukal et al., 1995; Schmidt et al., 1995). Andererseits ist es oftmals schwierig, mit Hilfe der Genmodifizierung von Tumorzellen, speziell von primären Tumorzellen, eine Genexpression genau innerhalb dieses effektiven Dosisfensters zu erreichen.

In der DE-A1 44 11 425 wird eine zelluläre Tumorvakzine beschrieben, die Zytokine in Depotform enthält. Konkret wird als Zytokin IL-2 vorgeschlagen, wobei Erfordernisse hinsichtlich der Dosis und der Freisetzungskinetik des Zytokins nicht berücksichtigt werden.

In der WO 94/21808 wird eine Tumorvakzine aus autologen, Zytokingen-transfizierten Zellen beschrieben, von der u.a. gezeigt wird, daß die Schutzwirkung von Zytokinen (IL-2, IFN- γ und GM-CSF) dosisabhängig ist, wobei gezeigt wird, daß nicht unbedingt mit der höchsten Dosis die beste Schutzwirkung erreicht wird, ein optimal wirksames Dosisfenster wird jedoch nicht definiert.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, eine alternative, einfach herzustellende Tumorvakzine bereitzustellen, die es ermöglicht, das immunstimulierende Zytokin gezielt am Ort der Vakzinierung im therapeutisch wirksamen Dosisbereich über einen längeren Zeitraum freizusetzen.

Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß gelöst mit einer Tumorvakzine auf der Grundlage von Tumorantigenen, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie als wirksamen Bestandteil neben einer Tumorantigenquelle ein Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung für IFN- γ enthält, wobei die wirksame IFN- γ -Dosis 50 ng bis 5 μ g und der Freisetzungszeitraum eine halbe Stunde bis 8 Tage beträgt.

11.06.11.96

Bevorzugt beträgt die IFN- γ -Dosis 100 ng bis 2 μ g, insbesondere 100 ng bis 1 μ g.

Als günstig hat sich ein Freisetzungzeitraum ab einer halben Stunde bis zu 2 bis 3 Tagen erwiesen, es zeigten jedoch auch längere Freisetzungzeiträume von bis zu 8 Tagen eine günstige Antitumorwirkung.

Bevorzugt werden mindestens ca. 75 % der wirksamen IFN- γ -Dosis in einem Freisetzungzeitraum von einer Stunde bis 3 Tage freigesetzt.

Die Freisetzung von IFN- γ sollte möglichst sofort, spätestens jedoch eine Stunde nach Applikation der Vakzine einsetzen. Wesentlich für die Wirksamkeit der Tumorvakzine ist in jedem Fall, daß IFN- γ und Tumorantigenquelle im wesentlichen gleichzeitig zur Verfügung stehen.

Das Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung wird im folgenden als "Slow Release System" bezeichnet.

Grundsätzlich sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sämtliche Slow Release Systeme geeignet, die die geforderten Bedingungen hinsichtlich Dosierung und Freisetzung von IFN- γ erfüllen.

Bevorzugt liegt das Slow-Release-System in Form von Liposomen vor.

Liposomen sind synthetische Lipidvesikel, die aus einer oder mehreren konzentrischen Lipidschichten bestehen, die wässrige Abteilungen umschließen. In die wässrigen Abteilungen können wasserlösliche Substanzen eingeschlossen, in die Lipidschichten fettlösliche

Substanzen eingebaut werden. Da diese Vesikel aufgrund ihrer Struktur, ihrer biologischen Abbaufähigkeit und ihrer geringen Toxizität vielseitig verwendbar sind, wurden sie in den letzten Jahren zunehmend als Träger verschiedenster therapeutischer Wirkstoffe, u.a. für Tumortherapeutika, verwendet.

Liposomen werden in zwei Hauptkategorien eingeteilt. Zur ersten Kategorie zählen die uni- oder multilamellaren "konventionellen" Liposomen. Diese Liposomen haben aufgrund ihrer raschen Aufnahme durch das retikuloendotheliale System eine relativ kurze Halbwertszeit.

Um bei der Anwendung der Liposomen *in vivo* unspezifische Interaktionen mit Zellen des retikuloendothelialen Systems zu verringern und einen unerwünscht raschen Abbau zu verhindern, sind die Liposomen in einer Ausführungsform der Erfindung modifiziert. Bevorzugt sind die Liposomen mit kovalent gekoppeltem Polyethylenglykol (PEG) modifiziert ("PEGyliert"; Mori et al., 1991; Chonn et al., 1992; Woodle et al., 1994). Die Menge des eingesetzten PEG beträgt zwischen 2 und 10 % PEG-gekoppeltem Lipid im Liposom (m/m), das Molekulargewicht von PEG bevorzugt zwischen 750 und 5000 D (Klibanov et al., 1990.; Blume et al., 1990; Mayhew et al., 1992; Papahadjopoulos et al., 1991; Senior et al., 1991; Mori et al., 1991; Yoshioka, 1991). Die Liposomen können auch mit anderen Gruppierungen, wie amphiphilen Vinylpolymeren, modifiziert sein, um deren Halbwertszeit *in vivo* zu verlängern.

Der Stand der Technik stellt eine große Vielfalt von Liposomen und Herstellungsmethoden dafür zur Verfügung, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sind,

1108-1108

stellvertretend sei verwiesen auf die US Patente 4,485,045 und 4,544,545; Epstein et al., 1985; Hwang et al., 1980; EP 0 036 676; EP 0 052 322; EP 0 088 046; EP 0 102 324; EP 0 142 641; EP 0 143 949; DE 3,218,121; Eppstein, 1982; Bergers et al., 1993; Kedar et al., 1994; Herrmann und Stricker, 1995; Koppenhagen, 1997. Die Auswirkung der Inkorporierung von IFN- γ in Liposomen auf dessen biologische Wirkung wurde u.a. von Mellors et al., 1989, und Saravolac et al., 1996, beschrieben.

Als Alternative für Liposomen als Slow Release System kommen für den Einbau von IFN- γ biologisch abbaubare polymere Materialien in Form von Mikrosphären (Maulding, 1987; Golumbek et al., 1993; Johnson et al., 1996; Lee et al., 1997; Cleland, 1997; Cleland und Jones, 1996) oder Minipellets (Fujiwara et al., 1990; Marumo et al., 1997) in Betracht; diese können ebenfalls, zwecks Verlängerung der Halbwertszeit, modifiziert sein.

Als Tumorantigenquelle der erfindungsgemäßen Vakzine können sämtliche Tumorantigene enthaltenden Zusammensetzungen dienen, die geeignet sind, im behandelten Individuum eine spezifische Immunantwort auszulösen.

In einer Ausführungsform der Erfindung liegen die Tumorantigene in Form von Tumorzellen vor.

Bei den Tumorzellen der Vakzine kann es sich um autologe oder allogene Tumorzellen handeln.

In einer Ausführungsform der Erfindung sind die Tumorzellen der Vakzine autolog. Dabei handelt es sich um Zellen, die dem zu behandelnden Patienten entnommen werden, ex vivo gegebenenfalls inaktiviert, mit dem

IFN- γ freisetzenden Slow-Release-System vermischt und danach dem Patienten wieder verabreicht werden (Methoden zur Herstellung von autologen Tumorvakzinen sind dem Fachmann bekannt und u.a. in der WO 94/21808, auf deren Offenbarung Bezug genommen wird, beschrieben.)

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Tumorzellen allogen, d.h. sie stammen nicht von dem zu behandelnden Patienten (Barth et al., 1994; Morton et al., 1992). Der Verwendung von allogenen Zellen, die im allgemeinen in Form von etablierten Tumorzelllinien zur Verfügung stehen, wird vor allem dann der Vorzug gegeben, wenn arbeitsökonomische Überlegungen eine Rolle spielen; die Herstellung von individuellen Vakzinen für jeden einzelnen Patienten ist arbeits- und kostenaufwendig, außerdem treten bei einzelnen Patienten Schwierigkeiten bei der *ex vivo* Kultivierung der Tumorzellen auf, so daß Tumorzellen nicht in ausreichend großer Zahl erhalten werden, um eine Vakzine herstellen zu können. Bevorzugt wird als Tumorantigenquelle eine Mischung von Zellen aus mehreren allogenen Tumorzelllinien verwendet. Tumorvakzine aus allogenen Tumorzellen sind Stand der Technik, derartige Vakzinen wurden u.a. von Adler et al., 1995 und Hayashi et al., 1993; Oratz et al., 1989; Morton et al., 1989; Bystryn et al., 1986, beschrieben.

Als Antigenquelle können auch Lysate von Tumorzellen, wie z.B. von Mitchell, et al., 1993, beschrieben, verwendet werden.

In einer Ausführungsform der Erfindung besteht die Tumorantigenquelle aus Tumorzellen, insbesondere allogenen Tumorzellen, die mit Peptiden beladen sind, die von Tumorantigenen abgeleitet sind. Eine Tumorvakzine, die erfindungsgemäß als Antigenquelle in

Verbindung mit der IFN- γ -Slow Release-Formulierung verwendet werden kann, wurde von Buschle et al., 1997, beschrieben; als Alternative zu Tumorzellen können auch Antigen-präsentierende Zellen verwendet werden, z.B. dendritische Zellen, die mit den Tumorantigenpeptiden beladen sind, wie in der DE-A1 196 07 044 oder von Buschle et al., 1997, beschrieben.

Die Identifizierung und Isolierung von Tumorantigenen und Tumor-assozierten Antigenen (TAs) bzw. davon abgeleiteter Peptide (z.B. beschrieben von Wölfel et al., 1994 a) und 1994 b); Carrel et al., 1993; Lehmann et al., 1989; Tibbets et al., 1993; oder in den veröffentlichten internationalen Anmeldungen WO 92/20356, WO 94/05304, WO 94/23031, WO 95/00159 beschrieben), war die Voraussetzung dafür, Tumorantigene als solche als Immunogene zu verwenden, wie z.B. von Anchini et al., 1996, beschrieben.

In einer Ausführungsform der Erfindung liegen die Tumorantigene in Form von Tumorantigenen als solchen vor, um eine zelluläre Immunantwort auszulösen, wie sie zur Eliminierung von Tumorantigen tragenden Tumorzellen erforderlich ist (Bakker et al., 1994; Cox et al., 1994). Die Tumorantigene können in Form von Proteinen oder in Form von Tumorantigen-abgeleiteten Peptiden vorliegen.

Ein Beispiel für eine zellfreie Tumorvakzine auf der Grundlage von Tumorantigenen oder davon abgeleiteten Peptiden, die als Antigenquelle im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet ist, wurde von Schmidt et al., 1996, sowie in der WO 97/30721 beschrieben, auf diese Offenbarungen wird hiermit Bezug genommen. Eine Übersicht über Krebsvakzine auf der Grundlage von Peptiden, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung als

Antigenquelle geeignet sind, wird von Melief et al., 1996, gegeben.

Die Antigenquelle kann gegebenenfalls ebenfalls in Form einer Slow-Release-Formulierung vorliegen.

Eine Tumorvakzine auf der Grundlage von Tumorantigenen, z.B. in Form von Tumorzellen, in Kombination mit einem "slow release"-System, in das IFN- γ eingebaut ist, hat gegenüber Tumorvakzinen aus gen-modifizierten Tumorzellen, die IFN- γ exprimieren, den Vorteil einer exakten Steuerung der Zytokinfreisetzung am Vakzinierungsort und damit einer reproduzierbaren und genauen Dosierung des Zytokins. Ferner ist der Arbeits- und somit Kostenaufwand für die Herstellung wesentlich geringer.

Die Ergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Versuche zeigen, daß die Immunisierung von Mäusen mit Vakzinen, bestehend aus bestrahlten Tumorzellen und muIFN- γ -Liposomen eine systemische Immunantwort induzieren kann, die die Tiere vor einer Tumorentwicklung schützt. Dieser Schutzeffekt zeigt eine klare Abhängigkeit von der IFN- γ Dosis. Der für eine Immunisierung wirkungsvollste Dosisbereich wurde im Bereich von 100 ng bis 1 μ g muIFN- γ gefunden.

Es konnte gezeigt werden, daß der Schutzeffekt außer von der IFN- γ -Dosis auch von der verzögerten Freisetzung des Zytokins abhängig ist.

Dabei war die verzögerte Freisetzung von Liposomen-verkapseltem muIFN- γ hinsichtlich der Anti-Tumorschutzwirkung ebenso effizient wie muIFN- γ , das von genmodifizierten Zellen exprimiert wurde. Freies

muIFN- γ , zugemischt zu den bestrahlten Zellen, bewirkte einen weitaus geringeren bzw. überhaupt keinen Schutz.

Sowohl Menge an eingebautem IFN- γ als auch dessen Freisetzung am Wirkungsort sind von Größe, Form, Struktur und chemischer Zusammensetzung des jeweils gewählten Slow-release Systems abhängig.

Gegebenenfalls kann die erfindungsgemäße Vakzine neben IFN- γ ein oder mehrere weitere Zytokine enthalten, z.B. Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- ω , TNF- α . Das gegebenenfalls zusätzlich in der Vakzine enthaltene Zytokin kann in demselben oder in einem verschiedenen Slow-Release System vorliegen wie IFN- γ . Das Zytokin kann auch dadurch am Applikationsort verfügbar gemacht werden, daß als Tumorantigenquelle Tumorzellen (vorzugsweise allogene) verwendet werden, die mit dem entsprechenden Zytokin-Gen transfiziert sind. Derartige modifizierte Tumorzellen sowie Verfahren zu ihrer Herstellung wurden u.a. in der WO 95/09655, WO 95/31107, WO 93/10219, WO 93/07906 und WO 94/21808 sowie von Belli et al., 1997 beschrieben.

Gegebenenfalls enthält die Vakzine zusätzlich unspezifische immunstimulierende Adjuvantien, wie LPS (Lipopolysaccharid) oder BCG (Bacillus Calmette Guerin).

Die Formulierung der Vakzine kann zweckmäßig wie folgt vorgenommen werden:

Im allgemeinen wird zunächst das für eine effiziente Antitumorwirkung geeignete Verhältnis von Antigen:IFN- γ -Dosis ermittelt. Eine dazu geeignete Vorgehensweise besteht darin, daß ausgehend von einer im Hinblick auf die Ausbildung einer Antitumor-Antwort suboptimalen Menge an Antigen (im Falle einer optimalen Antigendosis

von ca. 10^8 Tumorzellen z.B. ca. 10^7 Zellen) durch Titration diejenige Menge an IFN- γ ermittelt wird, bei der der Antitumoreffekt eine Steigerung erfährt.

Danach wird die definitive Menge an Antigen optimiert.

Um eine wirksame Antigendosis zur Verfügung zu stellen, enthält die Formulierung im Falle der Verwendung von Tumorzellen als Antigenquelle im allgemeinen ca. 10^5 bis 10^9 , vorzugsweise 10^6 bis 10^8 Zellen; im Falle der Verwendung einer zellfreien Antigenquelle wird die Menge an Tumorantigenen bzw. davon abgeleiteten Peptiden so bemessen, daß eine Immunantwort ausgelöst wird, die der durch die oben genannte Tumorzellzahl ausgelösten Immunantwort etwa äquivalent ist.

Gegebenenfalls kann in einem weiteren Schritt überprüft werden, ob die Beifügung eines weiteren Zytokins oder eines weiteren unspezifischen Adjuvans eine Steigerung der Antitumorwirkung herbeiführt.

Um ein hinsichtlich der IFN- γ -Dosis und Freisetzungskinetik den Anforderungen entsprechendes Slow Release System auszuwählen, wird zweckmäßig wie folgt vorgegangen (im folgenden wird der Begriff "Liposomen" stellvertretend für alle Präparationen verwendet, die eine verzögerte Abgabe von Proteinen erlauben, z.B. Mikrosphären oder Minipellets):

Um die Beladungseffizienz der Liposomen mit IFN- γ zu testen, wird IFN- γ in verschiedene Liposomenpräparationen inkorporiert, freies IFN- γ abgetrennt und der IFN- γ -Gehalt der Liposomen bestimmt, z.B. mittels ELISA, HPLC oder mittels der Proteinbestimmungsmethode nach Lowry (Lowry et al., 1951). Für die biologische Wirksamkeit der

erfindungsgemäßen Vakzine ist der absolute Beladungsgrad der Liposomen mit IFN- γ nicht kritisch, wesentlich ist die in einem bestimmten Zeitraum verfügbare Dosis. Es hat sich jedoch als vorteilhaft erwiesen, wenn die IFN- γ -Konzentration in der Liposomenpräparation mindestens etwa 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, vorzugsweise mehr als 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ beträgt. (Bei geringem absolutem Beladungsgrad der Liposomen kann die gewünschte immunmodulatorische Wirkung von IFN- γ in der Vakzine erzielt werden, indem der Anteil der Liposomenpräparation in der Vakzine erhöht wird).

In einem nächsten Schritt wird die Freisetzungskinetik der Liposomen bestimmt.

Im Falle von Liposomen ist der Einbau bzw. die Freisetzungskinetik der Zytokine von der Ladung, dem hydrophilen/hydrophoben Charakter des Zytokins einerseits, und von den chemischen und physiko-chemischen Charakteristika der Liposomen andererseits abhängig. Wichtigste Charakteristika der Liposomen, die die Freisetzungskinetik bestimmen, sind deren Größe, Anzahl der Lipidschichten (uni-/multilamellar), Ladung und Fluidität der Lipidschichten. Diese wiederum werden bestimmt durch die chemische Zusammensetzung der Lipidschichten (Eppstein, 1982; Koppenhagen, 1997).

Das Prinzip geeigneter Tests für die Bestimmung der Freisetzungskinetik beruht darauf, die IFN- γ -beladenen Liposomen in einem physiologischen Puffersystem, welches zwecks Simulation von *in vivo* Bedingungen Serum enthält, zu inkubieren und in bestimmten Zeitabständen im Überstand die IFN- γ -Konzentration zu bestimmen, z.B. mittels ELISA. In der Fachliteratur für die jeweiligen Slow Release Systeme sind jeweils spezifische Tests

beschrieben, mit denen die Freisetzungskinetik des Therapeutikums bestimmt werden kann.

Vorzugsweise wird zusätzlich zu den *in vitro* Tests die Freisetzungskinetik *in vivo* bestimmt. Analog zur letztlich für die therapeutische Anwendung vorgesehenen Applikationsform (Vakzinierungsart, Applikationsroute) wird Versuchstieren das entsprechende Injektionsvolumen, das aus Gründen der Nachweisbarkeit zweckmäßig einen höheren IFN- γ -Gehalt aufweist als die vorgesehene wirksame Dosis der Vakzine, verabreicht. Dann wird den Versuchstieren in definierten Zeitabständen Blut abgenommen und der IFN- γ -Gehalt bestimmt, z.B. mit ELISA.

Alternativ kann die in *in vivo* Freisetzungskinetik bestimmt werden, indem eine Liposomenpräparation appliziert wird, in der die Liposomen und das darin enthaltene IFN- γ eine unterschiedliche radioaktive Markierung aufweisen. Nach der Injektion werden in definierten Zeitabständen Proben aus der Vakzinierungsstelle entnommen und die Restradioaktivitäten bestimmt. Die absoluten Werte geben Aufschluß über noch an der Impfstelle vorhandene Liposomen/IFN- γ ; eine proportionale Abnahme der beiden Werte läßt darauf schließen, daß das IFN- γ noch in den Liposomen verkapselt ist.

Die in der erfindungsgemäßen Tumorvakzine enthaltene wirksame Kombination Tumorantigene/IFN- γ liegt derart vor, daß eine zytotoxische T-Zell-Anwort und/oder eine humorale Immunantwort ausgelöst wird, die die Tumorzellen eliminiert bzw. im Fall der prophylaktischen Anwendung einen Schutz vor Tumorbildung gewährleistet.

16.10.2000

Dem Fachmann stehen geeignete Tests zur Verfügung, um das Ausmaß der Immunantwort festzustellen und auf Grundlage der Testergebnisse eine optimale Dosierung an Tumorantigen/IFN- γ zu ermitteln.

Die Auslösung einer zellulären Immunantwort kann durch den Nachweis antigenspezifischer CTLs bestätigt werden (Coligan et al., 1991). Ein weiterer Nachweis für das Vorliegen einer zellulären Immunantwort ist dann gegeben, wenn in Abwesenheit von T-Zellen in einem Versuchstier (welche dadurch erzielt wird, daß man das Tier mit Antikörpern behandelt, die CD4- oder CD8-Zellen depletieren) keine Immunantwort auftritt (Coligan et al., 1991).

Eine zelluläre Immunantwort kann auch durch den Nachweis einer "delayed-type hypersensitivity" (DTH)-Reaktion in immunisierten Tieren gezeigt werden. Hierzu werden Peptide in die Fußsohle von Mäusen injiziert und die Anschwellung der injizierten Stelle gemessen (Grohman et al., 1995; Puccetti et al., 1994). Zur Messung der DTH-Reaktion im Patienten werden diesem Antigene intradermal injiziert und die Rötung bzw. die Anschwellung der injizierten Stelle gemessen.

Die Induktion einer humoralen Immunantwort durch Antigene bzw. davon abgeleitete Peptide, die Fremdantigene für den Organismus sind bzw. Antigene, die vom zu behandelnden Organismus in geringer Konzentration exprimiert werden, kann durch Nachweis von spezifischen Antikörpern im Serum bestimmt werden. Eine geeignete Methode zur Antikörpertiterbestimmung im Serum ist der Enzyme Linked Immunoassay (ELISA). Dabei werden die spezifischen Antikörper nach Bindung an das zur Immunisierung verwendeten Peptids mit einer Farbreaktion nachgewiesen. Eine alternative Methode ist der Western

Blot. Hierbei binden spezifische Serumantikörper an das auf einer Membran immobilisierte Peptid. Gebundene Antikörper werden schließlich wiederum mit einer Farbreaktion nachgewiesen (Coligan et al., 1991).

Im nächsten Schritt wird die immunmodulatorische Wirkung der Vakzine im Tierversuch gemessen. Hierzu können u.a. etablierte Tumormodelle, bei denen bestrahlte Tumorzellen zumindest eine geringe Immunantwort induzieren, oder Tumormodelle, bei denen von Immunzellen erkannte Tumorantigen-Peptidsequenzen bekannt sind, eingesetzt werden. Die Vakzine wird in variierenden Verhältnissen Tumorantigenquelle/IFN- γ -Slow Release System appliziert. Der Schutz vor Tumorwachstum ist ein Maß für die Wirksamkeit der Tumorvakzine.

Das Injektionsvolumen beträgt im allgemeinen 50 μ l bis 2 ml.

Die erfindungsgemäße Vakzine liegt im allgemeinen als Suspension in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger vor, vorzugsweise einem wässrigen Träger. Als wässrige Träger können z.B. Wasser, gepuffertes Wasser, Salzlösung (0.4 %) Glycinlösung (0.3 %), Hyaluronsäure und ähnliche bekannte Träger verwendet werden. Die Zusammensetzung kann außerdem pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe enthalten, wie Puffersubstanzen sowie anorganische Salze, um einen normalen osmotischen Druck und/oder eine wirksame Lyophilisierung zu erreichen. Beispiele für derartige Zusätze sind Natrium- und Kaliumsalze, z.B. Chloride und Phosphate, Saccharose, Glukose, Proteinhydrolisate, Dextran, Polyvinylpyrrolidon oder Polyethylenglycol. Die Zusammensetzungen können mittels herkömmlicher Techniken sterilisiert werden, z.B. mittels Sterilfiltration. Die Zusammensetzung kann in dieser Form unmittelbar

abgefüllt oder auch lyophilisiert und vor dem Gebrauch mit einer sterilen Lösung gemischt werden.

Gegebenenfalls liegt die erfindungsgemäße Tumorvakzine in Form zweier getrennter Formulierungen vor (Tumorantigenquelle und IFN- γ -Slow-Release-Formulierung), die vor der Verabreichung vereinigt werden.

Die erfindungsgemäße Tumorvakzine kann prophylaktisch oder therapeutisch verabreicht werden. Die Applikationsroute ist bevorzugt intradermal, subkutan oder intramuskulär.

Figurenübersicht

- Fig. 1: Bestimmung der Freisetzungskinetik von muIFN- γ aus Liposomen *in vitro*
- Fig. 2: Immunisierung von Mäusen mit einer Vakzine aus Tumorzellen und muIFN- γ (1. Experiment)
- Fig. 3: Immunisierung von Mäusen mit einer Vakzine aus Tumorzellen und muIFN- γ (2. Experiment)
- Fig. 4: Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von T-Lymphozyten nach Immunisierung mit einer Vakzine aus Tumorzellen und muIFN- γ

19.08.1996

Beispiel 1

Einbau von humanem IFN- γ in Liposomen

Optimierung der chemischen Zusammensetzung und Herstellungsmethode der Liposomen

Da die Assoziation von IFN- γ und Liposomen in erster Linie ladungsabhängig ist, wurden Vorversuche mit humanem IFN- γ durchgeführt, in denen die Ladung der Liposomen variiert wurde. Es wurde festgestellt, daß mit steigender negativer Ladung der Liposomen die Effizienz der Inkapsulierung bzw. Assoziation von IFN- γ zunimmt.

Für diese Versuche wurde das molare Verhältnis der negativen und neutralen Phospholipide (Ei-Phosphatidylcholin (PC) und Ei-Phosphatidylglycerin (PG)) verändert.

Es wurde festgestellt, daß die Assoziationseffizienz bei einem molaren Verhältnis von 1:0 lediglich 20 % betrug, während sie bei einem molaren Verhältnis von 1:4, 4:1 oder 9:1 auf mehr als 95 % anstieg.

Weiterhin wurde festgestellt, daß die Gegenwart von Salz im Hydratationsmedium während der Inkapsulierung die Effizienz des Einbaus von IFN- γ in Liposomen verringert; z.B. verringerte sich bei einem Verhältnis von PC:PG=9:1 nach Zugabe von 0.9 % NaCl die Einbaurate von 90 % auf 35 %). Deshalb wurde anstelle der physiologischen Kochsalzlösung eine 5 % Glukoselösung zugesetzt, um eine isotonische Lösung (Isotonie ist für die Applikation notwendig) zu erhalten.

Für die subkutane (s.c.) Verabreichung werden große, nicht großendefinierte ("unsized") Liposomen

(multilamellare Vesikel) verwendet, weil für eine optimale immunstimulierende Wirkung bei der prophylaktischen oder therapeutischen Anwendung der Impfung die Bildung eines s.c. Depots erforderlich ist und nur große Liposomen während längerer Zeit an der Injektionsstelle bleiben.

Ein zusätzlicher Einbau von Cholesterin (PC:PG:Cholesterin=5:1:4) in den Lipid-Bilayers, der die Liposomen steifer macht, beeinflußte weder Einbaurate noch Freisetzungskinetik von IFN- γ .

Stabilitätsuntersuchungen von Liposomen (PC:PG:Cholesterin=5:1:4) bei 4°C zeigten keine veränderte Stabilität.

Die IFN- γ enthaltenden Liposomen zeigten sich bei 4°C mindestens einen Monat lang stabil. Nach 30 Tagen wurde eine IFN- γ -Aktivität von mehr als >80 %, bestimmt mittels HPLC, nachgewiesen. Die 20 % Abnahme der Aktivität ist offensichtlich auf einen Abbau von IFN- γ zurückzuführen; die Proteinbestimmung nach Lowry et al., 1951, ergab, daß keine nennenswerten Mengen an Protein aus den Liposomen freigesetzt wurden (die Lagerung von freiem IFN- γ bei 4°C zeigt ebenfalls einen Verlust der Aktivität von 20 %).

Beispiel 2

Induktion einer systemischen Immunantwort gegen Melanomzellen durch Immunisierung mit Vakzinen, bestehend aus einer Mischung aus bestrahlten Tumorzellen und muIFN- γ -Liposomen

a) Herstellung von muIFN- γ -Liposomen:

Rekombinantes murines IFN- γ wurde in 10 mM Succinatpuffer (10 mM Natriumsuccinat, pH=5, 5% Glukose) auf eine Konzentration von 100 μ g/ml verdünnt.

Die Liposomen wurden durch Hydrierung eines Lipidfilms wie folgt hergestellt: Es wurden Ei-Phosphatidylcholin (EPC, Lipoid GmbH, Ludwigshafen) und Ei-Phosphatidylglyzerin (EPG, Lipoid GmbH, Ludwigshafen) (in einem molaren Verhältnis von 9:1) in 5 Volumenanteilen Äthanol/Methanol (=Lösungsmittel) gelöst. (100 μ mol Lipid entspricht 75 mg, entsprechend wurden 0.9 x 40 x 0.75 mg/ml EPC und 0.1 x 40 x 0.75 mg/ml EPG verwendet.) Das organische Lösungsmittel wurde unter Vakuum in einem Drehkolben evapioriert. Der somit erhaltene dünne Lipidfilm wurde mit der IFN- γ -Lösung durch Schwenken des Kolbens mit Glasperlen abgelöst. Bei dieser Methode bilden sich größtenteils multilamellare Liposomen (MVL), in die das IFN- γ eingeschlossen ist bzw. an denen ein Teil des IFN- γ gegebenenfalls adsorbiert ist. Nicht-eingebautes bzw. nicht-adsorbiertes IFN- γ wurde durch Ultrazentrifugation bei 250 000 x g während 60 min in 10 mM Succinatpuffer, pH=5, 10% Saccharose abgetrennt. Die Liposomen enthielten ca. 86 μ g IFN- γ /ml und 36 μ mol/ml Phospholipide. Sie wurden bei 4°C gelagert.

b) Bestimmung der Freisetzungskinetik des muIFN- γ aus den Liposomen in vitro

Zur Bestimmung der Freisetzungskinetik von IFN- γ aus den Liposomen wurden IFN- γ -enthaltende Liposomen in PBS/10%FCS-Puffer (ca. 0.5 - 1 ml Liposomen pro ml Puffer) bei 37°C, was eine *in vivo* Umgebung simuliert, über die in Fig.1 angegeben Zeitspannen inkubiert. Nach

Inkubation wurden die Proben mit Saccharoselösung versetzt und zentrifugiert, um die Liposomen und das freigesetzte Protein zu trennen. Die untere Phase wurde von den Liposomen getrennt und bis zur Bestimmung des IFN- γ Gehaltes bei -20°C eingefroren. Der Gehalt an IFN- γ wurde mit Hilfe eines ELISA (BIO Source) bestimmt.

Es wurde eine verzögerte Freisetzung des Zytokins aus den Liposomen gefunden. Ein Großteil des Zytokins wird innerhalb des 1. Tages freigesetzt. Die Freisetzung setzt sich jedoch über mehrere Tage fort und ist noch nach 8 Tagen detektierbar (Fig.1).

c) Maus-Melanomzellen

Die Maus-Melanomzelllinie B16F10 (Fidler et al., 1975) stammt vom NIH DCTDC Tumor Repository. Die Zellen wurden in T175 Kulturflaschen in DMEM, 10% FCS, 2 mM Glutamin gezüchtet.

d) Vorbereitung der Vakzinen

B16F10 Melanomzellen ($1-2 \times 10^7$ Zellen pro T175 Kulturflasche) wurden mit γ -Strahlen einer Dosis von 50 Gy bestrahlt, um eine weitere Vermehrung der Zellen zu unterbinden. 2-6 h nach Bestrahlung wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung trypsinisiert, in 3 Waschschritten mit Kulturmedium, PBS und Ringer's Lösung gewaschen und auf eine Konzentration von 4×10^6 Zellen pro ml (in Ringer's Lösung) eingestellt. Die Zellsuspension wurde zu gleichen Volumenteilen mit Liposomensuspensionen, enthaltend μ IFN- γ in verschiedenen Konzentrationen (100 μ g/ml, 20 μ g/ml, 4 μ g/ml, 0.8 μ g/ml und 0 μ g/ml) gemischt. Die fertigen Vakzinen enthielten somit eine Tumorzellkonzentration

von 2×10^6 Zellen pro ml und Konzentrationen von liposomal verkapselten muIFN- γ von entsprechend: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

e) Immunisierung der Mäuse

1. Experiment:

Syngene C57Bl/6 Mäuse (weiblich, Alter: 8 Wochen) wurden durch subkutane Injektion der Vakzinen in die rechte hintere Flanke immunisiert. Das Fell war dazu an beiden hinteren Flanken abrasiert worden. Das Injektionsvolumen war 100 μl pro Maus. Somit wurden pro Maus 2×10^5 B16-Zellen und entsprechend 5 μg , 1 μg , 200 ng oder 40 ng liposomal verkapseltes muIFN- γ pro Immunisierung appliziert. Pro Dosisgruppe wurden 8 Mäuse immunisiert.

Parallel dazu wurden Gruppen von jeweils 8 Mäusen mit folgenden Kontrollvakzinen immunisiert :

- bestrahlte B16-Zellen
- bestrahlte B16-Zellen + Leer (=placebo) liposomen
- bestrahlte B16-Zellen + freies mu IFN- γ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- mu IFN- γ -genmodifizierte, bestrahlte B16-Zellen (die Transfektion wurde mit dem Adenovirus-unterstützten Gentransfersystem auf Grundlage der rezeptorvermittelten Endozytose, wie in der WO 94/21808 und von Zatloukal et al., 1995, beschrieben, durchgeführt; die mu IFN- γ Freisetzung betrug 120 ng pro 24 h)

Eine Woche nach der ersten Immunisierung erhielten die Mäuse eine Boosterimmunisierung mit denselben Vakzinen, wie sie für die erste Immunisierung verwendet worden war.

Nach einer weiteren Woche wurden die Tiere der hochtumorigen Dosis von 1×10^5 B16-Zellen ausgesetzt,

die an einer Stelle appliziert wurde, die entfernt (contralateral) von der Immunisierungsstelle lag. Zusätzlich wurde eine Gruppe (8 Tiere) von nicht-immunisierten Mäusen auf gleiche Weise den tumorigen Zellen ausgesetzt.

Acht Wochen nach der Tumorzellimplantation hatten alle (8/8) der nicht immunisierten Mäuse Tumore entwickelt. Demgegenüber waren 4 von 8 bzw. 3 von 8 Tieren der Gruppen, die mit bestrahlten Zellen und mu IFN- γ -Liposomen, enthaltend 200 ng bzw. 1 μ g mu IFN- γ , immunisiert worden waren, geschützt. Ein ähnlicher Schutzeffekt (3/8 tumorfreie Tiere) wurde für Tiere gefunden, die mit mu IFN- γ -genmodifizierten Zellen immunisiert worden waren.

Ein lediglich marginaler (nicht signifikanter) Effekt (1 von 8 geschützten Tieren) wurde für bestrahlte Zellen + Liposomen, enthaltend 40 ng mu IFN- γ , bestrahlte Zellen + freies mu IFN- γ (5 μ g) sowie für bestrahlte Zellen + Leerliposomen gefunden. Bestrahlte Zellen allein oder bestrahlte Zellen + Liposomen, enthaltend 5 μ g mu IFN- γ , hatten keinen Schutzeffekt. Die Entwicklung der Tumore in den Tieren ist in Tabelle I. und Fig. 2 zusammengefaßt.

2. Experiment:

Syngene C57Bl/6 Mäuse (weiblich, Alter: 9 Wochen) wurden durch subkutane Injektion der Vakzinen in die rechte hintere Flanke immunisiert. Das Fell war dazu an beiden hinteren Flanken abrasiert worden. Das Injektionsvolumen war 100 μ l pro Maus. Es wurden pro Maus 2×10^5 B16-Zellen sowie liposomal verkapseltes mu IFN- γ in Dosen von 4 μ g, 1 μ g, 200 ng oder 40 ng pro

Immunisierung appliziert. Pro Dosisgruppe wurden 8 Mäuse immunisiert.

Parallel dazu wurden Gruppen von jeweils 8 Mäusen mit folgenden Kontrollvakzinen immunisiert :

- bestrahlte B16-Zellen
- bestrahlte B16-Zellen + Leer (=placebo) liposomen
- bestrahlte B16-Zellen + freies muIFN- γ 4 μ g/ml
- bestrahlte B16-Zellen + freies muIFN- γ 1 μ g/ml
- bestrahlte B16-Zellen + freies muIFN- γ 200 ng/ml
- muIFN- γ -genmodifizierte, bestrahlte B16-Zellen (die muIFN- γ Freisetzung betrug 200 ng pro 24 h).

Eine Woche nach der ersten Immunisierung erhielten die Mäuse eine Boosterimmunisierung mit denselben Vakzinen, wie sie für die erste Immunisierung verwendet worden war.

Nach einer weiteren Woche wurden die Tiere der hochtumorigen Dosis von 1×10^5 B16-Zellen ausgesetzt, die an einer Stelle appliziert wurde, die entfernt (contralateral) von der Immunisierungsstelle lag. Zusätzlich wurde eine Gruppe (8 Tiere) von nicht-immunisierten Mäusen auf gleiche Weise den tumorigen Zellen ausgesetzt.

Acht Wochen nach der Tumorzellimplantation hatten alle (8/8) der nicht immunisierten Mäuse Tumore entwickelt. Demgegenüber waren 4 von 8 bzw. 3 von 8 Tieren der Gruppen, die mit bestrahlten Zellen und muIFN- γ -Liposomen, enthaltend 1 μ g bzw. 200 ng muIFN- γ , immunisiert worden waren, geschützt. Ein ähnlicher Schutzeffekt (4/8 tumorfreie Tiere) wurde für Tiere gefunden, die mit muIFN- γ -genmodifizierten Zellen immunisiert worden waren.

Ein geringer Schutzeffekt (1 von 8 Tieren geschützt) wurde für bestrahlte Zellen + Liposomen, enthaltend 40 ng muIFN- γ und für bestrahlte Zellen + freies muIFN- γ (1 μ g) gefunden. Bestrahlte Zellen oder bestrahlte Zellen + muIFN- γ -Liposomen, enthaltend 4 μ g muIFN- γ sowie Vakzine, bestehend aus bestrahlten Zellen + freies muIFN- γ (4 μ g oder 200 ng) hatten keinen Schutzeffekt. Die Entwicklung der Tumore in den Tieren ist in Tabelle II. und Fig.3 zusammengefaßt.

Beispiel 3

Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von T-Lymphozyten vakzinierter Tiere

Syngene C57Bl/6 Mäuse (weiblich, Alter: 9 Wochen) wurden durch subkutane Injektion der Vakzinen in die rechte hintere Flanke immunisiert. Das Fell war dazu an beiden hinteren Flanken abrasiert worden. Das Injektionsvolumen war 100 μ l pro Maus. Es wurden pro Maus 2×10^5 B16-Zellen sowie liposomal verkapseltes muIFN- γ in Dosen von 3.8 μ g (=hohe Dosis) und 300 ng (optimale Dosis) pro Immunisierung appliziert. Parallel dazu wurde eine Gruppe nur mit bestrahlten B16-Zellen immunisiert und eine weitere Gruppe wurde nur mit Puffer injiziert (Kontrollgruppe). Pro Gruppe wurden 4 Mäuse immunisiert. Eine Woche nach der ersten Immunisierung erhielten die Mäuse eine Boosterimmunisierung mit denselben Vakzinen, wie sie für die erste Immunisierung verwendet worden war.

Nach 13 Tagen wurden die Tiere getötet und die Milzen entnommen. Die Splenozyten wurden isoliert, innerhalb einer jeden Gruppe gepoolt und 5 Tage *in vitro* mit bestrahlten B16-Zellen restimuliert. Am 6. Tag wurde die zytotoxische Aktivität (CTL Aktivität) der Splenozyten

(Effektorzellen) gegen B16-Zellen (Targetzellen) mit Hilfe eines Europium-Freisetzung-Assays (Blomberg et al., 1993) gemessen. Die CTL-Aktivität (ausgedrückt als % spezifische Lyse (Zatloukal et al., 1993)) wurde für verschiedene Effektor:Target-Verhältnisse (100:1, 50:1, 25:1) bestimmt und ist in Fig.4 gezeigt. Splenozyten von Mäusen, die mit bestrahlten B16-Zellen und muIFN- γ -Liposomen im optimalen Dosisbereich (300 ng muIFN- γ) immunisiert worden waren, zeigten eine deutliche zytotoxische Aktivität gegenüber B16-Zellen (10 % spezifische Lyse) gegenüber einer ganz geringen background-Aktivität bei Kontrolltieren bzw. Tieren, die nur mit bestrahlten B16-Zellen immunisiert worden waren. Die Erhöhung der muIFN- γ Dosis auf 3.8 μ g (bereits hohe Dosis) führte zu einer Verringerung der CTL-Aktivität im Vergleich zur optimalen Dosis.

Tabelle I

Vakzinierung	Tumorfreie Mäuse (%) nach angegebener Anzahl von Wochen								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Puffer	62,5	0	0	0	0	0	0	0	0
B16	87,5	12,5	0	0	0	0	0	0	0
Liposomen+B16	100	25	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
IFN Liposomen (5 µg)+B16	100	12,5	0	0	0	0	0	0	0
IFN Liposomen (1 µg)+B16	100	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
IFN Liposomen (200 ng)+B16	100	62,5	50	50	50	50	50	50	50
IFN Liposomen (40 ng)+B16	100	37,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
freies IFN + B16	100	37,5	25	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
freies IFN + Liposomen + B16	100	37,5	25	25	25	25	25	25	25
IFN/B16	100	62,5	50	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
Anzahl tumorfreier Mäuse pro Anzahl injizierter Mäuse nach angegebener Anzahl von Wochen									
Vakzinierung	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Puffer	(5/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
B16	(7/8)	(1/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
Liposomen+B16	(8/8)	(2/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)
IFN Liposomen (5 µg)+B16	(8/8)	(1/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
IFN Liposomen (1 µg)+B16	(8/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)
IFN Liposomen (200 ng)+B16	(8/8)	(5/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)
IFN Liposomen (40 ng)+B16	(8/8)	(3/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)
freies IFN + B16	(8/8)	(3/8)	(2/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)
freies IFN + Liposomen + B16	(8/8)	(3/8)	(2/8)	(2/8)	(2/8)	(2/8)	(2/8)	(2/8)	(2/8)
IFN/B16	(8/8)	(5/8)	(4/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)

B16 = mit einer Dosis von 50 Gy bestrahlte B16F10 Melanomzellen

IFN/B16 = mit dem Gen für IFN-gamma transfizierte, mit 50 Gy bestrahlte B16F10 Melanomzellen

Tabelle II

Vakzinierung	Tumorfreie Mäuse (%) nach angegebener Anzahl von Wochen								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Puffer	37,5	0	0	0	0	0	0	0	0
B16	87,5	37,5	0	0	0	0	0	0	0
Liposomen + B16	87,5	25	0	0	0	0	0	0	0
IFN Liposomen (4 µg) + B16	100	12,5	0	0	0	0	0	0	0
IFN Liposomen (1 µg) + B16	100	62,5	62,5	50	50	50	50	50	50
IFN Liposome (200 ng) + B16	100	62,5	62,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
IFN Liposomen (40 ng) + B16	100	50	50	37,5	25	25	12,5	12,5	12,5
freies IFN (4 µg) + B16	100	25	25	0	0	0	0	0	0
freies IFN (1 µg) + B16	100	37,5	25	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
freies IFN (200) + B16	100	0	0	0	0	0	0	0	0
IFN/B16 (200 ng/24h)	100	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	50	50	50
Anzahl tumorfreier Mäuse pro Anzahl injizierter Mäuse nach angegebener Anzahl von Wochen									
Vakzinierung	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Puffer	(3/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
B16	(7/8)	(3/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
Liposomen + B16	(7/8)	(2/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
IFN Liposomen (4 µg) + B16	(8/8)	(1/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
IFN Liposomen (1 µg) + B16	(8/8)	(5/8)	(5/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)
IFN Liposomen (200 ng) + B16	(8/8)	(5/8)	(5/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)
IFN Liposomen (40 ng) + B16	(8/8)	(4/8)	(4/8)	(3/8)	(2/8)	(2/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)
freies IFN (4 µg) + B16	(8/8)	(2/8)	(2/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
freies IFN (1 µg) + B16	(8/8)	(3/8)	(2/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)
freies IFN (200) + B16	(8/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
IFN/B16 (200 ng/24h)	(8/8)	(5/8)	(5/8)	(5/8)	(5/8)	(5/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)

B16 = mit einer Dosis von 50 Gy bestrahlte B16F10 Melanomzellen

IFN/B16 = mit dem Gen für IFN-gamma transfizierte, mit 50 Gy bestrahlte B16F10 Melanomzellen

30

Literatur

Adler, A., et al., (1995), Cancer Biother 10(3): 211-224

Anchini, A., Mortarini, R., Maccalli, C., Squarcina, P., Fleischbauer, K., Mascheroni, L., and Parmiani, G. (1996), J. Immunol. 156: 208-217

Bakker, A.B.H., et al., (1994), J. Exp. Med. 179: 1005-1009

Barth, A., Hoon, D., Foshag, L., Nizze, J., Famatiga, E., Okun, E. and Morton, D. (1994), Cancer Res. 54: 3342-3345

Belli, F., et al., (1997), Cancer Immunol Immunother 44(4): 197-203

Berd, D., Maguire HC., McCue P. (1990), J. Clin. Oncol. 8: 1858-1863

Bergers, J.J., Den Otter, W., Dullens, H.F.J., Kerkvliet, C.T.M., and Crommelin, D.J.A. (1993), Pharmaceut. Research 10, 12: 1715-1721

Blomberg, K. und Ulfstedt, A.C., (1993), J. Immunol. Methods 160: 27-34

Blume et al, (1990), Biochim Biophys. Acta 1029: 91-7

Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., DePlaen, E., Lethe, B., Coolie, P., Boon, T. (1993), J. Exp. Med. 178: 489-495

Buschle, M., et al., (1997), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94(7): 3256-3261

Bystryn, J.C., et al., (1986), J Biol Response Mod 5(3): 211-224

Carrel, S. und Johnson, J.P., 1993, Current Opinion in Oncology 5, 383-389

Chonn, A.; Semple, S. C.; Cullis, P. R., (1992), J Biol Chem 267: 18759-65

Clary, B.M., Coveney, E., Blazer, D.G., Philip, R., and
Lyerly, H.K. (1996), *Surgery* 120: 174-181

Clary, B.M., Coveney, Philip, R., Blazer, D.G.,
Morse, M., Gilboa, E., and Lyerly, H.K. (1997),
Cancer Gene Therapy 4: 97-104

Cleland, J.L. und Jones, A.J., (1996), *Pharm. Res.*
13(10): 1464-1475

Cleland, J.L., (1997), *Pharm. Biotechnol.* 10:1-43

Coligan, J.E., et al., (1991), *Current Prot. in
Immunol.*, Kapitel 3, Wiley, New York

Coulie, P., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T.,
Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen,
E., Lurquin, C., Szikora, J-p., Renauld, J-c., Boon,
T. (1994), *J. Exp. Med.* 180: 35-42

Cox, A.L., et al., (1994), *Science* 264: 716-719

Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P.,
Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H.,
Pardoll, D. and Mulligan, R.C. (1993), *Proc. Natl.
Acad. Sci. USA* 90: 3539-43

Eppstein, D.A. (1982), *J. Interferon Research* 2, 1:
117-125

Epstein et al., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:
3688-3692

Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Golumbek, P.,
Levitsky, H., Simons, J.W., Karasuyama, H.,
Vogelstein, B. and Frost, P. (1990), *Cell* 60:
397-403

Ferrantini, M., Giovarelli, M., Modesti, A., Musiani,
P., Modica, A., Venditti, M., Peretti, E., Lollini,
P.-L., Nanni, P., Forni, G., and Belardelli, F.
(1994), *J. Immunol.* 153: 4604-4615

Fidler et al., (1975), *Cancer Res.* 35: 218-234

Fujiwara, T., Sakagami, K., Matsuoka, J., Shiozaki, S.,
Uchida, S., Fujioka, K., Takada, Y., Onoda, T., and
Orita, K. (1990), *Cancer Research* 50: 7003-7007

Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B., Cronin, K., Bannerji, R., and Gilboa, E. (1990), J. Exp. Med. 172: 1217-1224

Gaughler, B., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Romero, P., Gaforio, JJ., De Plaen, E., Lethe, B., Brasseur, F., Boon, T. (1994), J. Exp. Med. 179: 921-930

Golumbek, P.T., Azhari, R., Jaffee, E.M., Levitsky, H.I., Lazenby, A., Leong, K., and Pardoll, D.M. (1993), Cancer Research 53 (24): 5841-5844

Grohmann, U. et al., (1995), Eur. J. Immunol. 25, 2797-2802

Hayashi, Y., et al., (1993), Cancer 72 (3): 750-759

Herrmann, J. und Stricker, H., (1995), Eur. J. Pharm. Biopharm. 41 (6): 361-368

Hwang et al., (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77: 4030-4034

Jaffee, E.M., Thomas, M.C., Huang, A.Y.C., Hauda, K.M., Levitsky, H.I. and Pardoll, D.M. (1996), Journal of Immunotherapy 19 (3): 176-183

Johnson, O.F., Cleland, J.L., Lee, H.J., Charnis, M., Duenas, E., Jaworowicz, W., Shepard, D., Shahzamani, A., Jones, J.S., and Putney, SD. (1996), Nature Medicine 2, 7: 795-799

Kedar, E., Rutkowski, Y., Braun, E., Emanuel, N. and Barenholz, Y. (1994), J. Immunother. 16: 47-59

Klibanov et al, (1990), FEBS Letters 268: 235

Koppenhagen, F.J., (1997), Liposomes as delivery system for rekombinant interleukin-2 in anticancer immunotherapy, Thesis Utrecht Universitiy.

Lamont, A.G., and Adorini, L. (1996). IL-12: a key cytokine in immune regulation. Immunol Today 5: 214-217

Lee, H.J., et al., (1997), J. Pharmacol. Exp. Ther. 281 (3): 1431-1439

33
M 06. 7. 90

Lehmann, J.M., et al., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9891-9895

Longo, W.E. und Goldberg, E.P., (1985), Methods Enzymol. 112: 18-26

Lowry, O.H., et al., (1951), J. Biol. Chem. 193: 265-275

Marumo, K., et al., (1997), Int. J. Urol. 4(1): 55-61

Maulding, H.V., (1987), J. of Controlled Release 6: 167-176

Mayhew et al, (1992), Int. J. Cancer 51: 1-8

Melief, C. JM. et al., (1996), Current Opinion in Immunology (8), 651 - 657

Mellors, J.W., et al., (1989), Infect. Immun. 57(1): 132-137

Mitchell, M.S., et al., (1993), Ann. NY Acad. Sci. 12; 690: 153-166

Mori, A.; Klibanov, A. L.; Torchilin, V. P.; Huang, L., (1991), FEBS Lett 284: 263-6

Morimoto, Y. und Fujimoto, S., (1985), Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 2(1):19-36

Morton, D.L., et al., (1989), Semin Surg Oncol 5(6): 420-425

Morton, D., Foshag L., Hoon D., Nizze J., Famatiga E.m Wanek L., Chang C., Davtyan D., Gupta R. and Elashoff R. (1992), Ann Surg 216: 463-482

Oratz, R., et al., (1989), J Biol Response Mod 8(4): 355-358

Papahadjopoulos et al, (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 11460-4

Pardoll, D.M. (1995), Ann. Rev. Immunol. 13: 399-415.

Perez, E.A., Scudder, S.A., Meyers, F.A., Tanaka, M.S., Paradise, C. and Gandara, D.R. (1991), J. Immunother. 10: 57-62

Puccetti, P. et al., (1994), Eur. J. Immunol. 24, 1446-1452

Rosenberg, SA. (1988). Immunotherapy of patients with advanced cancer using interleukin-2 alone or in

combination with lymphokine activated killer cells.
In Important Advances in Oncology, ed. V de Vita, S Hellman, SA Rosenberg, pp. 217-257. Philadelphia: JB Lippincott.

Rosenberg, SA., Lotze, MT., Yang, JC., Aebersold, PA., Lineham, WM., Seipp, CA., Withe, DE. (1989), Ann. Surg. 210: 474-485

Rosenberg, S.A. (1991), Cancer Res. 51: 5074-5079.

Rosenberg, S.A., Anderson, W.F., Blaese, M.R., Ettighausen, S.E., Hwu, P. et al. (1992), Human Gene Therapy 3: 75-91

Rosenstein, M., Ettighausen, S.E. and Rosenberg, S.A. (1986), J. Immunol. 137: 1735-1742

Saravolac, E.G., et al., (1996), Antiviral Res. 29(2-3): 199-207

Schmidt, W., Schweighoffer, T., Herbst, E., Maass, G., Berger, M., Schilcher, F., Schaffner, G. and Birnstiel, M.L. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4711-4714

Schmidt, W., et al., (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(18): 9759-9763

Schmidt, W., et al., (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(7): 3262-3267

Schweighoffer, T., Berger, M., Buschle, M., Schmidt, W., and Birnstiel, M.L. (1996), Cytokines Mol. Ther. 2: 185-192

Senior, J.; Delgado, C.; Fisher, D.; Tilcock, C.; Gregoriadis, G., (1991), Biochim Biophys Acta 1062: 77-82

Tibbets, L.M., et al., (1993), Cancer, Jan. 15., Vol. 71, 2, 315-321

Torchilin, V. P.; Klibanov, A. L.; Huang, L.; S, O. D.; Nossiff, N. D.; Khaw, B. A., (1992), Faseb J 6: 2716-9

Torchilin, V. P., et al., (1994), Biochim Biophys Acta 1195: 181-184

35
M 08.1.96

Torchilin, V. P., und Papisov, M. I., (1994), J Liposome Res 4(1): 725-739

van der Bruggen, PC., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., DePlaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T. (1991), Science 264, 1643-1650

Willmott, N., et al., (1989), J. Pharm. Pharmacol. 41(7): 433-438

Woodle, M. C.; Newman, M. S.; Cohen, J. A., (1994), J Drug Target 2: 397-403

Wölfel, T. et al., (1994) a), Int. J. Cancer 57, 413-418

Wölfel, T. et al., (1994) b), Eur. J. Immunol. 24, 759-764

Yoshioka, (1991), Biomaterials 12: 861-4

Zatloukal, K., Schmidt, W., Cotten, M., Wagner, E., Stingl, G. und Birnstiel, M.L. (1993), Gene 135: 199-207

Zatloukal, K., Schneeberger, A., Berger, M., Schmidt, W., Kosik, F., Kutil, R., Cotten, M., Wagner, E., Buschle, M., Maass, G., Payer, E., Stingl, G. and Birnstiel, M.L. (1995), J.Immunol. 154, 3406-3419

Zier, K. and B. Gansbacher. (1995), Hum. Gene Ther. 6:1259-1265

36
M 05.11.96

Patentansprüche

1. Tumorvakzine auf der Grundlage von Tumorantigenen, dadurch gekennzeichnet, daß sie als wirksamen Bestandteil neben einer Tumorantigenquelle ein Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung für IFN- γ enthält, wobei die wirksame IFN- γ -Dosis 50 ng bis 5 μ g und der Freisetzungszeitraum eine halbe Stunde bis 8 Tage beträgt.
2. Tumorvakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die wirksame IFN- γ -Dosis 100 ng bis 2 μ g beträgt.
3. Tumorvakzine nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die wirksame IFN- γ -Dosis 100 ng bis 1 μ g beträgt.
4. Tumorvakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Freisetzungszeitraum eine halbe Stunde bis 2 bis 3 Tage beträgt.
5. Tumorvakzine nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß ca. 75% der IFN- γ -Dosis binnen eines Zeitraums zwischen einer Stunde und 3 Tagen freigesetzt werden.
6. Tumorvakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung aus Liposomen besteht.

7. Tumorvakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung aus Mikrosphären besteht.
8. Tumorvakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung aus Minipellets besteht.
9. Tumorvakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorantigenquelle aus Tumorzellen besteht.
10. Tumorvakzine nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen allogene Tumorzellen sind.
11. Tumorvakzine nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen mit von Tumorantigenen abgeleiteten Peptiden beladen sind.
12. Tumorvakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorantigenquelle aus Antigen-präsentierenden Zellen besteht, die mit Tumorantigenpeptiden beladen sind.
13. Tumorvakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorantigenquelle aus Tumorantigenen als solchen oder davon abgeleiteten Peptide besteht.

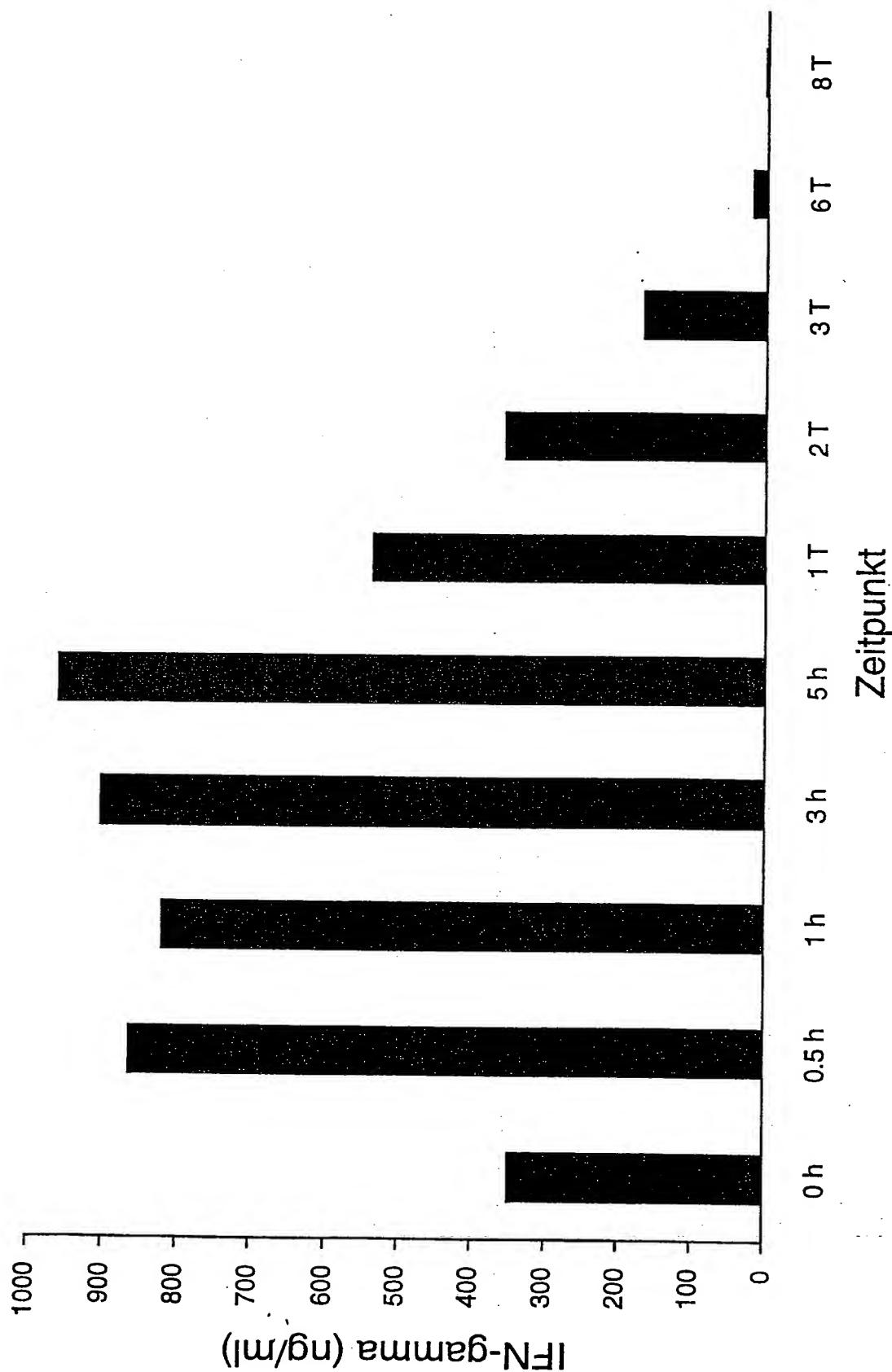
38
M 06.10.98

Zusammenfassung

Eine Tumorvakzine auf der Grundlage von Tumorantigenen enthält als wirksamen Bestandteil neben einer Tumorantigenquelle ein Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung für IFN- γ , wobei die wirksame IFN- γ -Dosis 50 ng bis 5 μ g beträgt, die während eines Zeitraums von mehreren Stunden bis zu mehreren Tagen freigesetzt wird. Das Abgabesystem für IFN- γ besteht bevorzugt aus Liposomen, die Tumorantigenquelle bevorzugt aus allogenen Tumorzellen.

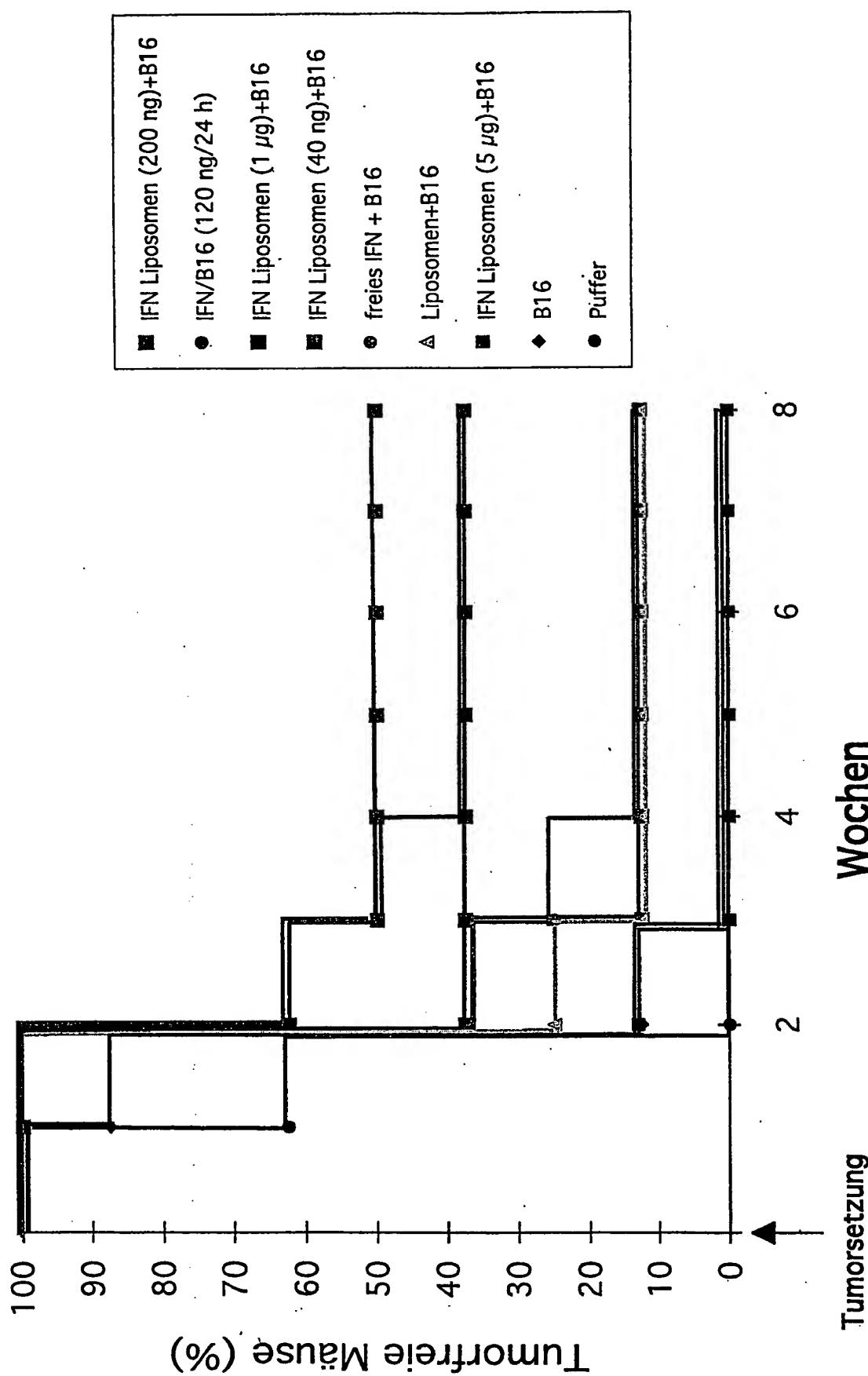
M 06. 1. 96

Fig. 1



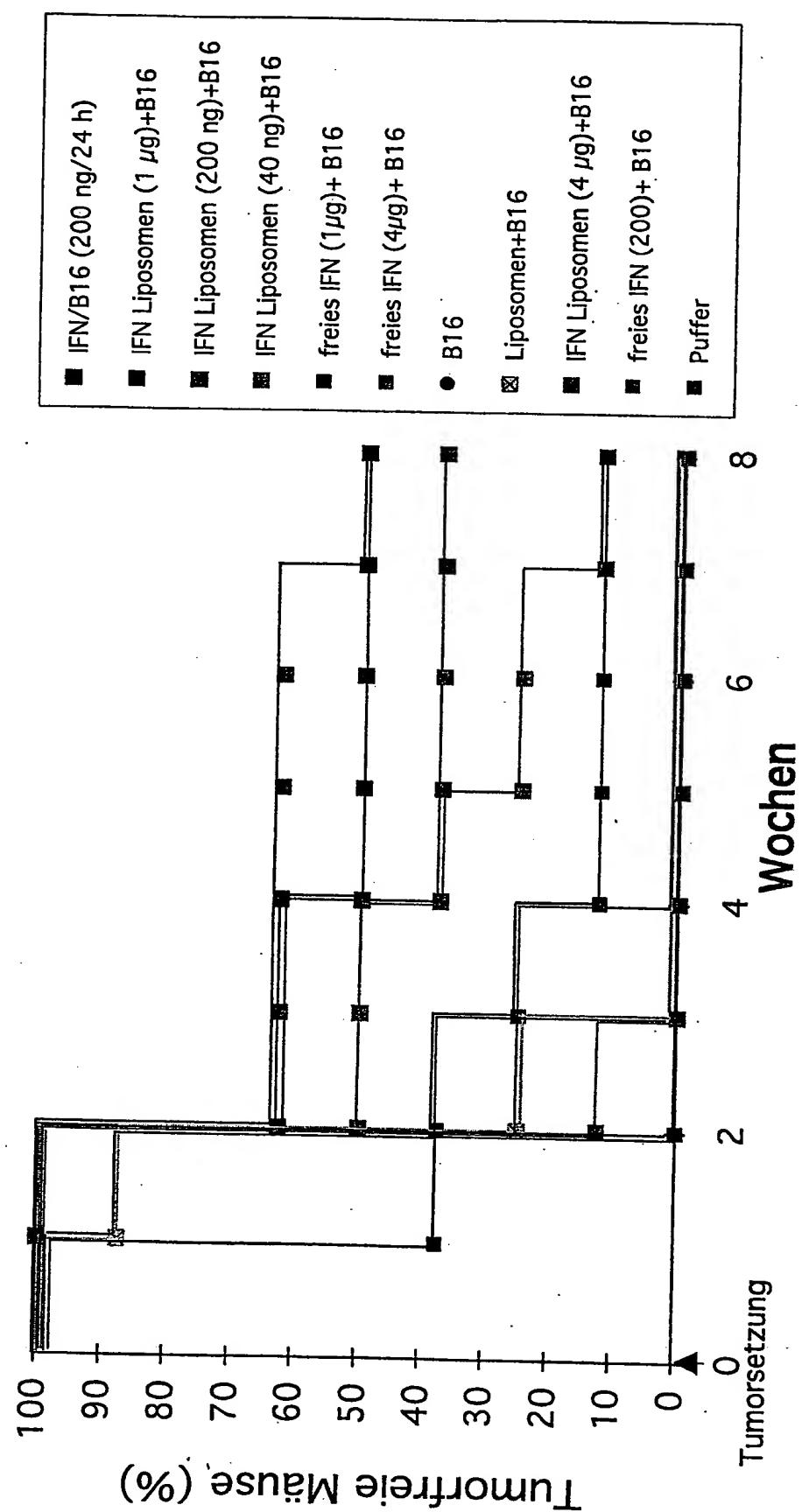
06.1.96

Fig. 2



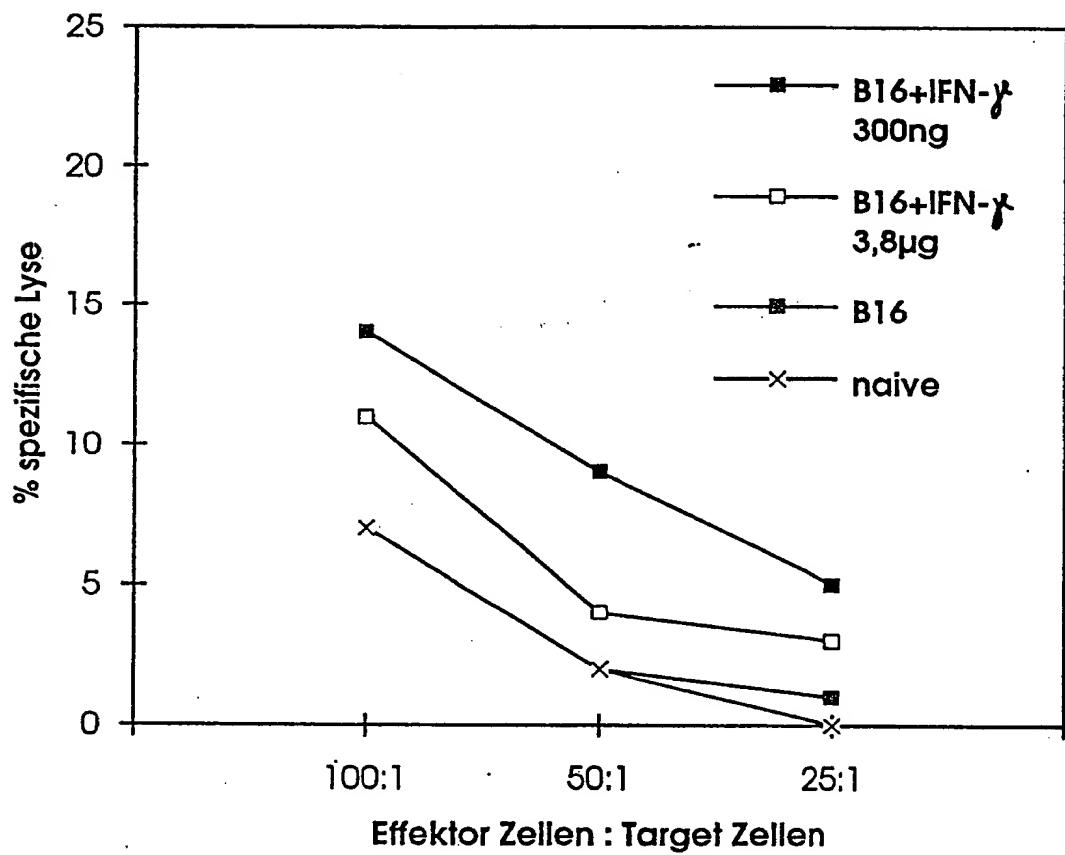
M 06.01.90

Fig. 3



M 06.11.96

Fig. 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)